

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01138

• 短篇论著 •

原发性胆汁性肝硬化患者外周血 APRIL/BLyS 系统及其受体的表达

Expression of APRIL/BLyS system and its receptors in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis and the relevant clinical significance

陈波¹, 朱萍², 谷明莉¹, 姚定康¹, 周晔¹, 仲人前¹, 邓安梅^{1*}

- 1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003
- 2. 中国人民解放军总后勤部上海干休所, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 APRIL(TNFSF13)/BLyS 系统及其受体 BCMA、TACI(TNFRSF13B)、BAFFR mRNA 在原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血中的表达水平和临床意义。**方法** 设计特异性引物和荧光探针, 实时检测 PCR 产物的荧光强度, 检测 42 例正常健康者和 56 例 PBC 患者外周血中 APRIL/BLyS 系统及其受体 mRNA 表达水平, 采用全自动酶标仪测定 PBC 患者血清中细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10 和 TNF- α 的水平。**结果** 与健康者相比, PBC 患者外周血中 APRIL(TNFSF13)、BLyS 及其受体 BCMA 的 mRNA 表达均升高($P < 0.01$), APRIL、BLyS mRNA 表达与 BCMA mRNA 表达有显著相关性(分别为 $r = 0.607$ 和 $r = 0.559$, P 均 < 0.01); APRIL mRNA 的表达与血清 IL-2 水平正相关($r = 0.462$, $P < 0.05$), BLyS mRNA 的表达与血清 IL-2、TNF- α 水平正相关($r = 0.740$, $P < 0.01$; $r = 0.381$, $P < 0.05$)。**结论** APRIL/BLyS 系统及其受体可能参与 PBC 的疾病进程, 为监控 PBC 的病情和有效治疗提供了新的途径。

[关键词] 原发性胆汁性肝硬化; 增殖诱导配体; B 淋巴细胞刺激因子; B 细胞成熟抗原; 穿膜蛋白活化物

[中图分类号] R 575.22 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1138-03

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种以肝内中小胆管的非化脓性、进行性炎性损伤为特征并最终发展为肝硬化的自身免疫性肝病。PBC 早期症状轻微, 临床表现不典型, 极易误诊为病毒性肝炎, 从而使病情迁延发展, 造成严重后果。此病多见于中年女性, 抗线粒体抗体(AMA)是其标志性抗体, 95% PBC 患者 AMA 阳性, 其对 PBC 的诊断尤其是 AMA-M, 特异性达 98%^[1], 临床和病理上均以胆汁淤积为主要表现, 伴轻度肝实质损伤。PBC 的患病率为(2~40)/10 万, 且随着人们对 PBC 认识增强, 检出率有逐步增高的趋势^[2]。

PBC 病因及发病机制尚不清楚, 可能与遗传、感染等多种因素打破机体的免疫耐受有关^[3], 研究表明增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)/B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)系统在肿瘤的发生、发展及免疫调节中起着重要作用^[4]。人 APRIL 与 TNF 家族成员 BLyS 有着高度的同源性, B 细胞成熟抗原(BCMA)和穿膜蛋白活化物(TACI)是 APRIL 与 BLyS 的共同受体。APRIL 在正常人组织中表达较弱, 而在多种肿瘤组织中存在

高表达, 这可能是由于 BCMA、TACI 的刺激引起了 T、B 淋巴细胞的周期改变, 类似于膜结合型和可溶型 TNF- α 的作用。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术分析了 PBC 患者外周血中 APRIL/BLyS 系统及其受体 mRNA 的表达, 并对其与疾病相关性进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 研究对象 本院确诊的 PBC 患者 56 例, 男 19 例、女 37 例, 平均年龄 45 ± 6.68 (36~65) 岁, 其中抗核抗体(ANA)阳性 52 例。诊断标准依据 2000 年美国肝病学会(AASLD)的诊断指南: (1)血清碱性磷酸酶等胆汁淤积指标升高; (2)通过腹部 B 超或 CT 排除其他胆道梗阻因素; (3)血清 AMA 或 AMA-M2 亚型阳性; (4)AMA 阴性患者肝脏组织学检查符合 PBC 的病理改变。正常健康对照组 42 例, 男 15 例, 女 27 例, 平均年龄 42 ± 3.86 (35~57) 岁。两组的年龄、性别构成比差异无统计学意义, 所有标本均为 HIV 阴性。

1.2 主要仪器及试剂 淋巴细胞分离液(Axis-Shield PoC AS, Norway); TRIzol 试剂, 反转录反应体系(Invitrogen, USA); TaqMan Universal PCR Master Mix(ABI, USA); DU640 型紫外分光光度计(Beckman, USA); GeneAmp 7900

[收稿日期] 2010-01-19 **[接受日期]** 2010-03-25

[基金项目] 国家高新技术研究发展计划(“863”计划, 2006AA02Z496), 国家自然科学基金(30671840, 3077201, 81072479), 上海市科学技术委员会基金(08QH14001, 09JC1405400). Supported by National High-tech R&D Program (“863” Program, 2006AA02Z496), National Natural Science Foundation of China(30671840, 3077201, 81072479), and Funds of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (08QH14001, 09JC1405400).

[作者简介] 陈波, 技师. E-mail: chenpoo222@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886074, E-mail: amdeng70@yahoo.com

Sequence Detection Systems(PE Biosystems, USA)。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)的分离及总 RNA 的提取 无菌抽取正常健康者和 PBC 患者外周血 3 ml, 枸橼酸钠抗凝。用等量生理盐水稀释后加于淋巴细胞分离液上, 以 $700 \times g$ 离心 20 min 后, 收集白膜层细胞。PBS 洗涤 2 次后加

入 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 取少量在紫外分光光度仪 260 nm 和 280 nm 下测得浓度和纯度, 且在 -70°C 保存备用。

1.3.2 引物和探针的设计与合成 利用 Beacon Designer 2.1 软件设计引物和探针(表 1), 均由美国 ABI 生物技术公司合成。

表 1 荧光定量 RT-PCR 的引物和探针序列

基 因	引物序列(5'→3')	探针序列(5'→3')
18S rRNA	上游: ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG 下游: TTC GTC ACT ACC TCC CCG G	FAM-CGC GCA AAT TAC CCA CTC CCG A-TAMRA
BLyS	上游: GCA ATC CAA TCG GAG GGT AA 下游: TCT GCA TCT CTA CCC CTA CTG TAC A	FAM-TGC CAG CAA ACC TA-TAMRA
APRIL	上游: AGT CCT GCT TGC CAA TTT CAG 下游: GGC CGG GTG TGT TGG AA	FAM-CAG GGA GTA GTG CAG GC-TAMRA
TACI	上游: CTC AAG GCC CCG TCA AAG T 下游: GCT TCC ATC GCG TGA TCC T	FAM-CGG CCA AGT CTT C-TAMRA
BCMA	上游: CTT AGC TGC CGC GAA GAC A 下游: TGA ACT TCG CCT GCT TCG T	FAM-AGA CAG CCC CCG TAA G-TAMRA
BAFFR	上游: AGT TTG GTG TGC TTG CCT TTG 下游: CCA CCT TCA AGG GCT GTC A	FAM-CTT CAG ACC TCA CCA TCT-TAMRA

BLyS: B 淋巴细胞刺激因子; APRIL: 增殖诱导配体; TACI: 穿膜蛋白活化物; BCMA: B 细胞成熟抗原; BAFFR: B 细胞激活因子受体

1.3.3 反转录合成 cDNA 取总 RNA $2 \mu\text{l}$, 随机引物 $1 \mu\text{l}$, 10 mmol/L dNTP $1 \mu\text{l}$, DEPC 水 $6 \mu\text{l}$ 放置 65°C 孵育 5 min, 置冰上 1 min; 准备 cDNA Synthesis Mix: $10 \times$ RT Buffer $2 \mu\text{l}$, 25 mmol/L MgCl_2 $4 \mu\text{l}$, 0.1 mol/L DTT $2 \mu\text{l}$, RNase OUT $1 \mu\text{l}$, SuperScript III RT $0.5 \mu\text{l}$; 加 $9.5 \mu\text{l}$ cDNA Synthesis Mix 入 RNA/primer mixture, 离心, 孵育 25°C 10 min, 50°C 50 min, 85°C 5 min, 置冰上, 离心后加入 $1 \mu\text{l}$ RNase H, 37°C 20 min; 产物 cDNA 置 -20°C 保存。

1.3.4 PCR 反应 $10 \mu\text{l}$ 反应体系: 模板 cDNA $1 \mu\text{l}$, PCR Master mix $5 \mu\text{l}$, 上下游引物、探针各 $0.2 \mu\text{l}$, RNAase-free 水 $3.4 \mu\text{l}$ 。扩增条件: 50°C 2 min; 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环。反应在 ABI Prism 7900 sequence detector (ABI 公司) 中进行, 反应结束后, 计算并绘制出各基因和内参 18S rRNA 的标准曲线, 结果由 ABI 7900HT 软件 SDS 2.1 系统保存并分析。

1.3.5 IL-2、IL-4、IL-10 和 TNF- α 测定 采用 ELX800 全自动酶标仪检测研究对象血清中的 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 的浓度。

1.4 统计学处理 靶基因与管家基因 Ct 值之差表示靶基因的相对表达量。以 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间比较采用成组 t 检验。检验水平(α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 PBC 患者 PBMCs 中 APRIL/BLyS 系统及其受体 mRNA 的表达 荧光定量 PCR 技术分析结果显示(图 1), PBC 患者 PBMCs 中 APRIL/BLyS mRNA 表达量升高 ($P < 0.01$), APRIL/BLyS 的 3 种受体中, BCMA mRNA 表达量明

显升高 ($P < 0.01$), TACI、BAFFR mRNA 表达量与正常对照组比较无明显变化。

经统计学分析, PBC 患者中 BLyS mRNA 表达与其受体 BCMA mRNA 表达正相关 ($r = 0.559$, $P < 0.01$), APRIL mRNA 表达与其受体 BCMA mRNA 表达正相关 ($r = 0.607$, $P < 0.01$)。

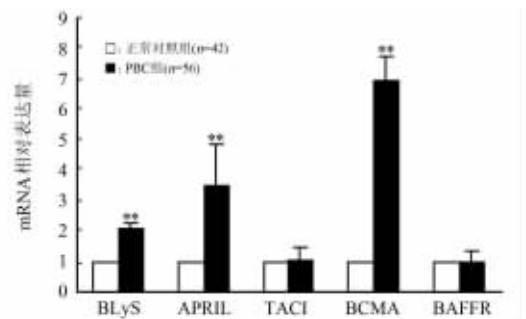


图 1 PBC 患者 PBMCs 中 APRIL/BLyS 系统及其受体 mRNA 的表达

PBC: 原发性胆汁性肝硬化。 ** $P < 0.01$ 与正常对照组相比; $\bar{x} \pm s$

2.2 APRIL/BLyS mRNA 表达与 PBC 患者血清中 IL-2、TNF- α 相关性分析 PBC 患者血清中细胞因子水平检测结果见表 2, 其中 IL-2、TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$); 统计学分析结果显示: PBC 患者中 BLyS mRNA 表达与 IL-2 水平正相关 ($r = 0.740$, $P < 0.01$), APRIL mRNA 的表达与 IL-2 亦正相关 ($r = 0.462$, $P < 0.05$); BLyS mRNA 的表达与 TNF- α 水平正相关 ($r = 0.381$, $P < 0.05$), 而 APRIL mRNA 表达与 TNF- α 水平无相关 ($r = 0.271$, $P = 0.147$)。

表 2 PBC 患者血清中细胞因子分析

$[\bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})]$

组别	n	IL-2	IL-4	IL-10	TNF- α
正常对照组	42	25.2 \pm 3.92	26.1 \pm 3.0	46.2 \pm 9.0	46.2 \pm 9.91
PBC组	56	170.1 \pm 5.00* *	28.1 \pm 4.0	49.1 \pm 5.0	135.1 \pm 9.50* *

PBC: 原发性胆汁性肝硬化. * * $P < 0.01$ 与正常对照组相比

3 讨论

研究发现 PBC 患者的免疫自稳系统受损,免疫耐受遭到破坏^[5],导致大量针对自身的抗体产生。自身抗体作为诊断 PBC 的标志物已被广泛应用于临床,但目前还没有常规检测自身反应性 T 细胞的特异性指标。T 细胞产生的细胞因子检测在一定程度上反映了 T 细胞的活化程度。几种细胞因子的联合检测可反映不同辅助性 T 细胞(Th)亚群的活化,如 IL-2、TNF- α 代表 Th1 细胞活性,主要介导细胞免疫应答;IL-4、IL-10 代表 Th2 细胞活性,主要介导体液免疫。正常情况下 Th1 和 Th2 细胞通过分泌细胞因子交叉调节,相互抑制,处于动态平衡状态,对维持机体的免疫自稳起着重要作用。细胞因子 IL-2、TNF- α 与自身抗体的产生密切相关^[6],在自身免疫性疾病的发生、发展过程中起重要作用。IL-4、IL-10 主要由单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞分泌,在细胞免疫中作为一种重要的负调节因子,通过抑制 T 细胞、巨噬细胞分泌致炎因子;刺激 B 淋巴细胞参与体液免疫调节;抑制 IFN 诱导的抗原呈递细胞,降低抗原递呈能力;抑制巨噬细胞的辅佐功能,导致 Th1 细胞和 NK 细胞活化、增殖受抑制;抑制 Th0 细胞向 Th1 细胞的转化,抑制炎症细胞的迁移等干预细胞介导的免疫。

APRIL 是肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)的一名新成员,即 TNFSF13,APRIL 与其他 TNF 家族成员 BLyS(33%)、FasL(20%)、TNF- α (20%)高度同源,主要表达于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞和某些肿瘤细胞,可以通过上调 Bcl-2 影响 T 细胞的存活,在 T 细胞非依赖性抗原反应中发挥重要作用,但在其他细胞功能中的作用尚不清楚。APRIL 过表达不仅在多种肿瘤细胞的增殖、存活及促肿瘤形成过程中有独特作用,而且与免疫系统的调节异常亦有密切关系。BLyS 有很强的 B 细胞趋向性,能选择性刺激 B 淋巴细胞增殖和免疫球蛋白的产生,在体液免疫中起着重要作用,BLyS 缺失能够导致机体免疫功能低下。

BCMA 和 TACI 是 APRIL 与 BLyS 的共同受体^[7],BCMA 表达于 B 细胞表面,TACI 表达于 B 细胞和活化 T 细胞表面。TACI 与 BLyS 优先结合,BCMA 与 APRIL 优先结合。BCMA 和 TACI 都可与 APRIL 结合,但任何一种结合对于肿瘤的增殖都不是特异的,推测可能存在其他影响 APRIL 促增殖效应发挥的特异性受体。本研究着重探讨了 PBC 患者外周血中 APRIL/BLyS 基因及其受体的表达在病程发生和发展中的临床意义。

本研究结果表明,在 PBC 患者外周血中,APRIL/BLyS 系统的基因表达及其受体 BCMA mRNA 的表达都明显升高($P < 0.01$),而且显著正相关($r = 0.559, P < 0.01$),提示 APRIL/BLyS mRNA 的检测可作为监测病情的免疫指标之

一。PBC 患者的血清细胞因子与肝功能损伤指标有一定的相关性,在肝功能受损时,血清 IL-2 和 TNF- α 水平增高。IL-2 和 TNF- α 可能是通过活化机体内 T 细胞参与肝脏功能免疫损伤,而 IL-4 和 IL-10 可能是通过抑制机体内 T 细胞活化来延缓病情发展和减轻肝功能损伤。本研究中,PBC 患者 APRIL/BLyS mRNA 表达与血清 IL-2 正相关、BLyS mRNA 表达与血清 TNF- α 正相关,表明细胞因子与肝脏功能状态、肝损害的发生发展密切相关。

研究表明,特殊细胞因子的出现对于 PBC 胆管损伤的发病机制可能有重要作用,控制自身抗体的产生以减弱 PBC 患者的自身免疫反应,有利于 PBC 患者的治疗^[8]。免疫抑制疗法能有效控制 PBC 患者的病情^[9],但能否通过降低 PBC 患者外周血中 APRIL/BLyS 基因及其受体 BCMA 的表达量,实现减少血清中分泌性免疫球蛋白的含量,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Van de Water J, Cooper A, Surh C D, Coppel R, Danner D, Ansari A, et al. Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis[J]. N Engl J Med, 1989, 320:1377-1380.
- [2] Feld J J, Heathcote E J. Epidemiology of autoimmune liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18:1118-1128.
- [3] Kofschoten G M, Pradet-Balade B, Hahne M, Medema J P. TWE-PRIL: a fusion protein of TWEAK and APRIL[J]. Biochemi Pharmacol, 2003, 15:1427-1432.
- [4] Gershwin M E, Mackay I R. The causes of primary biliary cirrhosis: convenient and inconvenient truths [J]. Hepatology, 2008, 47:737-745.
- [5] Ueno Y, Moritoki Y, Shimosegawa T, Gershwin M E. Primary biliary cirrhosis: what we know and what we want to know about human PBC and spontaneous PBC mouse models [J]. J Gastroenterol, 2007, 42:189-195.
- [6] Ramadori G, Christ B. Cytokines sand the hepatic acute-phase response[J]. Semin Liver Dis, 1999, 19:141-155.
- [7] Roschke V, Sosnovtseva S, Ward C D, Hong J S, Smith R, Albert V, et al. BlyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases[J]. J Immunol, 2002, 169:4314-4321.
- [8] Jones D E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis [J]. Clin Liver Di, 2008, 12:305-321.
- [9] Rennert P, Schneider P, Cachero T G, Thompson J, Trabach L, Hertig S, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth [J]. J Exp Med, 2000, 192:F35-F38.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩